

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 9 年度博士課程 入学

氏名 李 榮 珍

指導教官 日比 忠明

### 植物病原菌類における ABC トランスポーター遺伝子の分布と その薬剤耐性に関わる機能に関する研究

植物病害防除のための手段として、現在、殺菌剤の施用は依然としてひとつの大きな柱だが、近年、環境保全重視の立場から開発された選択性の高い殺菌剤の普及に伴って、これら薬剤に対する耐性菌の出現が深刻な問題となっている。植物病原菌の薬剤耐性には各種の機構があるが、最近、一部の植物病原菌類において ABC トランスポーターがその薬剤耐性ならびに病原性に関与していることが示された。そこで本研究では、ABC トランスポーター遺伝子が各種植物病原菌類に普遍的に存在することを明らかにした後、イネいもち病菌の ABC トランスポーター遺伝子についてその薬剤耐性に関わる機能を解析した。得られた成果の概要は次のとおりである。

#### 1. 各種植物病原菌類における ABC トランスポーター遺伝子の分布

各種植物病原菌類における ABC トランスポーター遺伝子の分布を解析するため、分類学的に所属の異なる 7 種の植物病原菌類、すなわち、イネいもち病菌

*Magnaporthe grisea*、イネ紋枯れ病菌 *Thanatephorus cucumeris*、灰色かび病菌 *Botrytis cinerea*、タバコ赤星病菌 *Alternaria alternata* tobacco pathotype、ウリ類炭そ病菌 *Colletotrichum lagenarium*、トマト萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*、およびジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* について、本遺伝子の存在の有無をサザンハイブリダイゼーション法によって調査するとともに、PCR クローニングによってそれらの遺伝子断片を単離してその塩基配列を解析した。

#### (1) 各種植物病原菌類に関わる ABC トランスポーター遺伝子の存在

各植物病原菌類から抽出したゲノミック DNA に対し、*Penicillium digitatum* の ABC トランスポーター PMR1 の C-末端側の ABC 領域をコードしている 0.9 kb の DNA 断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析を行った結果、いずれの菌株からもシグナルが検出され、これらのゲノムに ABC トランスポーター遺伝子の配列が存在していることが示された。

#### (2) 各種植物病原菌類の ABC トランスポーター遺伝子の部分塩基配列

既知の ABC トランスポーター遺伝子の保存領域のアミノ酸配列に基づいて設計した degenerate プライマーを用い、各菌株のゲノミック DNA をテンプレートとした degenerate PCR を行って ABC トランスポーターの C-末端側の ABC 領域をコードしている DNA 断片を増幅し、それらの塩基配列を決定した。その結果、各種植物病原菌類における ABC トランスポーターの存在を確認するとともに、それらの塩基配列の相同性に基づいて各菌種の分子系統樹を作成した。

## 2. イネいもち病菌の薬剤耐性に関わる ABC トランスポーター遺伝子の機能

イネいもち病菌は日本の稲作に最大の被害をもたらす病害である。その防除には抵抗性イネ品種の育種や耕種的な防除とともに種々の薬剤が使われているが、現在のところ、幸いに薬剤耐性の深刻な問題は起こっていない。しかしながらイネいもち病がひとたび発生するとその被害は甚大であり、耐性菌の出現も大きな問題となる可能性がある。このような背景のもとに、本研究ではイネいもち病菌の ABC トラ

ンスポーターに着目し、その遺伝子の単離と構造決定ならびに薬剤耐性に関わる機能の解析を行った。

#### (1) イネいもち病菌の ABC トランスポーター遺伝子の構造

まず、degenerate PCR によってイネいもち病菌の ABC トランスポーター遺伝子断片の単離を試みた結果、計 5 種の ABC トランスポーターホモログの遺伝子断片が得られ、それらをそれぞれ H-I、H-II、H-III、H-IV、H-V と命名した。このうち、(2)に示した発現解析の結果から H-I が薬剤耐性に関与している可能性が高いことが示されたので、この全長の遺伝子を単離することとし、ゲノム DNA から IPCR と LA PCR によって本遺伝子全長を含む約 7.4 kb の DNA 断片をクローニングした。次いで、この DNA 断片の全塩基配列を決定したところ、2 箇所の ABC 領域と 2 箇所の膜貫通領域を含む典型的な MRP 型の ABC トランスポーター遺伝子の構造が明らかにされたため、この遺伝子を改めて ABC2 と命名した。さらに、この ABC2 と既知の ABC トランスポーターとの相同性を調べるため、保存性の高い C-末端側の ABC 領域のアミノ酸配列を互いに比較し、分子系統樹を作成して相互の類縁関係を解析した。その結果、ABC2 と、同じくイネいもち病菌の ABC1 とは 64.1%、*Saccharomyces cerevisiae* の PDR5 および SNQ2 とは、各々 64.8%および 55.9%、*Schizosaccharomyces pombe* の HBA2 とは 66.9%、*Candida albicans* の CDR1 とは 61.0%、*Penicillium digitatum* の PMR1 とは 65.5%の高い相同性が認められたが、UPGMA 法による分子系統樹上では、ABC2 は他の ABC トランスポーターとは独立したクラスターを形成した。

#### (2) 薬剤処理による ABC トランスポーター遺伝子の発現誘導

(1)で得られたホモログ遺伝子断片を含む各遺伝子の薬剤耐性との関連性を調べるため、イネいもち病菌に各種の薬剤をそれぞれ処理した後、全 RNA を抽出して上記 5 種のホモログ断片をそれぞれプローブとしたノーザンハイブリダイゼーションを行い、各遺伝子の発現誘導を調べた。その結果、H-II、H-III、H-IV、H-V 断片では、どの薬剤を処理した場合にもシグナルが検出されなかったが、H-I 断片では、ブ

ラストサイジン S と EDDP(edifenphos)の処理区で強いシグナルが検出され、またプロベナゾール、IBP、イソプロチオラン、トリシクラゾール、ピロキノンの処理区でも弱いシグナルが検出された。このことから H-I DNA 断片を含む ABC トランスポーター遺伝子 *ABC2* がこれらの薬剤処理によって誘導的に発現すると考えられた。さらに、*ABC2* の経時的な発現の変化を調べたところ、ブラスサイジン S を処理した場合、処理後 20 分でシグナルが現れ、1 時間後には発現量が急激に上昇する結果となった。EDDP の処理では時間の経過に伴った急激な変化はなく漸進的に発現量が上昇した。このように *ABC2* は上記の 7 種類の薬剤処理によっていずれもその発現が誘導されることから、この遺伝子がイネいもち病菌の各種薬剤耐性と関係している可能性が強く示唆された。

以上、本研究においては、各種植物病原菌類における ABC トランスポーターの普遍的な分布を明らかにした後、イネいもち病菌の ABC トランスポーター遺伝子 *ABC2* を単離し、本遺伝子が各種薬剤処理に対して誘導的な発現を示すことから、この遺伝子が薬剤耐性に関与している可能性を示唆した。各種植物病原菌類、とりわけイネいもち病菌における薬剤耐性と ABC トランスポーターとの関連を解明して行く上で極めて重要な知見が得られたものと考えられる。